

**MEIOSE EM HÍBRIDOS HEXAPLÓIDES DE  
CAPIM-ELEFANTE E MILHETO**

**ELISA APARECIDA ALVES PAIVA**

**2006**

ELISA APARECIDA ALVES PAIVA

**MEIOSE EM HÍBRIDOS HEXAPLÓIDES DE CAPIM-ELEFANTE E  
MILHETO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Paiva, Elisa Aparecida Alves

Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho / Elisa  
Aparecida Alves Paiva. -- Lavras : UFLA, 2006.

53 p. : il.

Orientador: Lisete Chamma Davide.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Meiose. 2. Híbridos hexaplóides. 3. *Pennisetum*. 4. Irregularidades  
meióticas. 5. Viabilidade do pólen. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD-631.523

**ELISA APARECIDA ALVES PAIVA**

**MEIOSE EM HÍBRIDOS HEXAPLÓIDES DE CAPIM-ELEFANTE E  
MILHETO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 04 de agosto de 2006

Dr. Antônio Vander Pereira

Embrapa

Prof. Dr. Sandro Barbosa

UNIFAL

Profa. Dra. Lisete Chamma Davide  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

*Aos meus pais, Luis e Luisa Helena,  
meus irmãos, Igor e Luigi e minha  
querida sobrinha Débora,*

**OFEREÇO.**

*Ao Kaesel, pelo carinho e incentivo,*

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Dra. Lisete Chamma Davide, orientadora, pelos ensinamentos, disponibilidade, dedicação e pela confiança depositada.

À Embrapa Gado de Leite, especialmente ao Pesquisador Dr. Antônio Vander Pereira, pela co-orientação, por ter concedido material genético para a realização deste trabalho e pela disponibilidade.

Ao Professor Dr. Sandro Barbosa, por ser um grande incentivador desde a graduação, por acreditar na realização deste trabalho e pela amizade.

Aos professores do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial a Elaine, pela dedicação, atenção, disponibilidade e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Citogenética: José Marcello, Caio, Fernanda, Rose, Saulo, Patrícia, Juliane, Ana Luiza, Letícia, Cristiane, Kátia, Leonardo, Amanda e Soraya, pela amizade e pelos bons momentos.

Aos meus pais, Luis e Luisa Helena, pela educação, amor, apoio e incentivo constante em minha formação profissional.

Aos meus irmãos, Igor e Luigi, pela força e incentivo.

A minha sobrinha, Débora, por ser a alegria da casa.

Aos meus familiares, em especial as minhas avós Cecília e Amélia, pelas orações e pelo apoio, aos tios, tias, primos e primas que sempre estiveram presentes.

Ao meu noivo, Kaesel, pelo amor e carinho, e pelo apoio constante nos momentos difíceis.

A amiga Cássia, que sempre me incentivou e que, mesmo longe, esteve presente.

A amiga Regiane, pelos bons momentos em Lavras.

Ao amigo Luciano, por me receber tão bem e por mostrar que as dificuldades podem ser superadas.

As minhas amigas de Elói Mendes: Marcele, Lilia, Daliane, Márcia, Denise, Eliana, Juceli e Janieli, pelo incentivo e pela amizade.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Citogenética do gênero <i>Pennisetum</i> .....	3
2.1.1 Origem e citogenética do capim-elefante ( <i>Pennisetum purpureum</i> Schumach) .....	3
2.1.2 Origem e citogenética do milheto ( <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br.) .....	6
2.2 Estratégias de melhoramento do capim-elefante .....	7
2.3 Meiose em híbridos interespecíficos .....	10
2.3.1 Pareamento cromossômico .....	10
2.3.2 Anormalidades meióticas .....	12
2.3.3 Eliminação cromossômica .....	14
2.3.4 Meiose em híbridos entre capim-elefante e milheto .....	16
2.4 Viabilidade do pólen .....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 Anormalidades meióticas .....	27
4.2 Viabilidade do pólen .....	40
4.3 Correlações entre fertilidade e irregularidades meióticas .....	43
5 CONCLUSÕES .....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	47

## RESUMO

PAIVA, Elisa Aparecida Alves. **Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto.** 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Uma estratégia dos programas de melhoramento do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*,  $2n = 2x = 28$ ) é a produção de híbridos entre o capim-elefante e milheto (*P. glaucum*,  $2n = 2x = 14$ ), originando híbridos triplóides e estéreis, porém, apresentando qualidade forrageira e proporcionando a obtenção de cultivares superiores para intensificar a produção leiteira. A esterilidade do híbrido triplóide, devido ao pareamento irregular dos cromossomos na meiose, constitui uma barreira aos programas de melhoramento do capim-elefante, pois impossibilita sua propagação via semente. A restauração da fertilidade desses híbridos pode ser conseguida por meio da duplicação cromossômica, propiciando sua propagação via semente. Entretanto, é comum, após a duplicação cromossômica, a instabilidade do material devido à eliminação cromossômica. Neste trabalho, foi avaliada a meiose de dez híbridos hexaplóides entre capim-elefante e milheto, sendo cinco de origem americana e cinco nacionais, objetivando avaliar os híbridos quanto à estabilidade meiótica e a viabilidade do grão de pólen. As anormalidades mais frequentes foram: pareamento irregular na diacinese, ascensão precoce de cromossomos na metáfase, segregação irregular na anáfase e formação de micronúcleos na telófase e em tétrades. Tais anormalidades afetaram diretamente a fertilidade do pólen pela produção de gametas aneuplóides, o que foi observado pelas baixas taxas de viabilidade do pólen, tanto por coloração quanto por germinação *in vitro*. O híbrido ‘Paraíso’ (cultivar comercial), apesar de apresentar alta taxa de irregularidades meióticas apresentou 49,96% de viabilidade pelos testes de coloração e 86,17% para germinação *in vitro*. A utilização desses híbridos nos programas de melhoramento do capim-elefante é discutida.

---

\* Comitê de Orientação: Profa. Dra. Lisete Chamma Davide - UFLA (Orientadora) e Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

## ABSTRACT

PAIVA, Elisa Aparecida Alves. **Meiosis in hexaploid hybrids of elephant grass and pearl millet**. 2006. 53 p. Dissertation (Master in Plant Genetics and Breeding) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.\*

A breeding strategy for elephant grass (*Pennisetum purpureum*  $2n = 2x = 28$ ), is hybrid production with pearl millet (*P. glaucum*,  $2n = 2x = 14$ ), originating sterile triploids hybrids. However, this hybrid presents good forage quality and provides superiors cultivars to intensify milk production. Sterility of triploid hybrid is due to irregular pairing of chromosomes in meiosis and constitutes a barrier to breeding programs, because it disables seeds propagation. Fertility can be restored by doubling the chromosomes allowing seeds propagation. However, it is common after chromosome doubling, the instability of the material due to chromosome elimination. This work describes meiosis of ten hexaploid hybrids between elephant grass and pearl millet, being five from american origin and five from brazilian origin. The objective was to assess the meiotic stability and pollen grain viability of the hybrids. The most frequent abnormalities were incorrect pairing during diakinesis, early ascension of chromosomes during metaphase, irregular segregation during anaphase and formation of micronucleus in telophase and in tetrads. Such abnormalities compromised pollen fertility by generating aneuploid gametes, presenting low pollen viability rates so much for staining as germination *in vitro*. 'Paraíso' hybrid (commercial cultivar), in spite of presenting high rate of meiotic irregularities, presented 49.96% of pollen viability for the staining test and 86.17% for germination *in vitro*. The use of these hybrids in breeding programs of elephant grass is discussed.

---

\* Guidance Committee: Dra. Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor) and Antônio Vander Pereira – Embrapa Gado de Leite.

## 1 INTRODUÇÃO

*Pennisetum* é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae sendo o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) e o milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) as espécies cultivadas de maior importância econômica e forrageira do gênero. O capim-elefante é uma espécie alotetraplóide com  $2n = 4x = 28$  (genomas A`A`BB) e o milheto uma espécie diplóide com  $2n = 2x = 14$  (genomas AA). Os programas de melhoramento têm utilizado a estratégia de obtenção de híbridos triplóides com  $2n = 3x = 21$  (A`AB) entre essas duas espécies, com interesse no desenvolvimento de cultivares mais produtivas, visando atender à forte demanda por novas variedades forrageiras que combinem elevada capacidade de produção com alta qualidade. Tais espécies são estreitamente relacionadas, apresentando boa capacidade de combinação genética, produzindo híbridos interespecíficos, estéreis, porém, de grande interesse forrageiro, uma vez que apresentam maior aceitação pelos bovinos do que o próprio capim-elefante. No entanto, a esterilidade desses híbridos, devido às irregularidades meióticas, tem sido apontada como um problema para os programas de melhoramento.

A utilização de antimitóticos que permitem a duplicação do número cromossômico representa uma importante ferramenta na obtenção de híbridos hexaplóides com  $2n = 6x = 42$  (genomas A`A`AABB) e com fertilidade restaurada. Essa tecnologia permite a introdução de híbridos entre capim-elefante e milheto com suposta meiose regular e produção de sementes, o que representa um ganho considerável nos programas de melhoramento do capim-elefante. Entretanto, é comum, após duplicação cromossômica, a instabilidade do complemento cromossômico, principalmente devido à eliminação cromossômica. Neste contexto, é de fundamental importância a identificação de

híbridos com estabilidade meiótica e apresentando alta taxa de pólen viáveis para utilização nos programas de melhoramento. Híbridos hexaplóides entre capim-elefante e milheto já foram obtidos tanto nos Estados Unidos da América (Hanna, 1981) quanto no Brasil (Barbosa, 2004). Neste trabalho, foram avaliadas a meiose e a viabilidade dos produtos meióticos de alguns desses híbridos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Citogenética do gênero *Pennisetum*

*Pennisetum* Rich. é um dos mais importantes gêneros da família Poaceae e caracteriza-se por sua ampla variabilidade genética descrita em, aproximadamente, 140 espécies que estão distribuídas por toda a faixa tropical do planeta. As espécies pertencentes a este gênero constituem um grupo heterogêneo, apresentando diferentes números básicos de cromossomos ( $x = 5, 7, 8$  e  $9$ ) e números cromossômicos variando de  $2n = 10$  a  $2n = 78$ , com níveis de ploidia variando de diplóide a octaplóide (Martel et al., 1997).

Harlan & Wet (1971) estabeleceram uma classificação genética para o gênero em conjuntos gênicos primário, secundário e terciário, com base na facilidade de introgressão de germoplasmas selvagens nas espécies cultivadas. O conjunto gênico primário é composto pelo milheto (*P. glaucum*) e outras duas espécies diplóides selvagens (*P. mollissimum* e *P. violaceum*), que apresentam  $2n = 2x = 14$  cromossomos. A espécie *P. purpureum* (capim-elefante), com  $2n = 4x = 28$  cromossomos, representa o segundo conjunto gênico e, no terceiro, encontram-se as demais espécies de *Pennisetum*, com  $x = 5, 7, 8$  e  $9$ .

Entre as espécies cultivadas e de grande importância forrageira do gênero *Pennisetum*, destacam-se o capim-elefante e o milheto (Brunken, 1977).

#### 2.1.1 Origem e citogenética do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach)

O capim-elefante tem a África tropical como centro de origem e diversificação, onde ocorre naturalmente em vários países (Brunken, 1977). É uma das espécies mais conhecidas e de maior importância econômica do gênero *Pennisetum*.

O capim-elefante tem número básico de cromossomos  $x = 7$ , é um alotetraplóide com  $2n = 4x = 28$  apresentando genomas A'A'BB e comportamento diplóide normal (Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998; Krishnaswamy & Raman, 1954; Martel et al., 1996; Techio, 2002). Evidências de várias pesquisas têm mostrado que os cromossomos do genoma A' são homeólogos aos do genoma A do milho, ao passo que o genoma B ainda não tem sua origem definida (Jauhar, 1981). Para Martel et al. (1997), o emprego de técnicas de hibridização genômica *in situ* (GISH) permitiria testar a origem alotetraplóide ou diplóide de *P. purpureum* e auxiliar na definição da espécie doadora do genoma B.

Para Jauhar (1981), o cariótipo do capim-elefante é constituído de cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e um acrocêntrico. Em contrapartida, Barbosa et al. (2003), ao estudarem alguns genótipos de capim-elefante, relataram a ocorrência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, porém, os últimos foram desconsiderados por estarem presentes em poucas metáfases analisadas.

Estudos realizados por Jauhar (1981) e Pantulu & Venkateswarlu (1968), sobre a morfologia dos cromossomos do capim-elefante, evidenciaram um cariótipo assimétrico (Stebbins, 1958), tendo o primeiro cromossomo se mostrado 2,7 vezes maior que o último, sendo os cromossomos 1 e 14 possuidores de região organizadora do nucléolo (Pantulu & Venkateswarlu, 1968). Resultados concordantes foram relatados por Barbosa et al. (2003), os quais observaram que a diferença de comprimento relativo entre o maior e o menor par de cromossomos, em alguns genótipos, é praticamente o dobro, podendo-se classificar tais cariótipos como assimétricos. No entanto, neste mesmo trabalho, alguns genótipos apresentaram a relação entre o maior e o menor braço menor que 2:1, indicando que o cariótipo desses genótipos enquadram-se na categoria simétrica. Alterações estruturais, como deleções e

adições, podem ter contribuído para aumentar ou diminuir a diferença de tamanho entre o maior e o menor cromossomo dos diferentes genótipos de capim-elefante, sendo esta divergência devido à variação intravarietal em *P. purpureum* (Barbosa et al., 2003).

Na meiose, apesar de ser uma espécie alotetraplóide, o capim-elefante comporta-se como um diplóide, apresentando bivalentes na diacinese e metáfase I. Ramalho et al. (2004) sugerem que, durante o processo evolutivo de algumas espécies poliplóides, deve ter ocorrido seleção de mecanismos que propiciam a maior formação de bivalentes ou a segregação regular dos cromossomos, resultando em baixos níveis de esterilidade.

Este fato constitui um aspecto que ainda não foi bem investigado nesta espécie e a formação de bivalentes parece ser assegurada pela presença de mecanismos supressores do pareamento homeólogo, semelhante ao identificado no trigo hexaplóide. Segundo Sears (1976), as bases para esses sistemas de diploidização no trigo hexaplóide foram reconhecidas pela descoberta de um gene *Ph1*, supressor do pareamento e algum mecanismo desse tipo parece estar presente no capim-elefante.

Em estudo da meiose de alguns genótipos de capim-elefante, Techio et al. (2006) observaram a freqüente formação de 14 bivalentes nas células em diacinese e metáfase I, o que confirma seu comportamento diplóide. Todavia, anormalidades, como ascensão precoce de cromossomos, presença de cromossomos pegajosos, núcleos assincrônicos e formação de micronúcleos na meiose I, foram observadas, ainda que em baixa freqüência.

Poucas descrições sobre o processo meiótico e relatos da existência ou não de distúrbios de pareamento e segregação são encontrados para capim-elefante. No entanto, a ocorrência de um sistema de diploidização é fundamental para a estabilidade genética e alta fertilidade de espécies que apresentam mais de um conjunto genômico, como o trigo e o capim-elefante.

### **2.1.2 Origem e citogenética do milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.)**

O milheto é uma espécie agronomicamente importante de duplo propósito, pois seus grãos são utilizados como fonte de alimento humano e na produção de ração animal e suas folhas e colmos como forragem. Essa gramínea é considerada o sexto cereal mais importante do mundo. Nutricionalmente, seu grão é superior ao do trigo, do arroz e do milho em relação ao conteúdo mineral, além de apresentar 16% de proteína (Abreu, 2002; Pantulu & Rao, 1982).

Sua origem e distribuição ocorrem em áreas tropicais da Ásia e África, sendo cultivado também na Índia.

O milheto é uma espécie diplóide, anual e de polinização cruzada, em função de seu hábito de floração protogínica. Apresenta  $2n = 2x = 14$  cromossomos, número determinado em 1929 por Rau (Techio, 2002) e genoma AA. Para Jauhar (1981), os cromossomos do milheto são metacêntricos e submetacêntricos; o cromossomo maior é 1,5 vez mais extenso que o cromossomo menor, o que permite classificá-lo como simétrico, de acordo com Stebbins (1958). Resultado similar a este foi relatado por Barbosa (2000) que observou uma diferença de 1,6 vez entre o maior e o menor cromossomo, o que não altera sua classificação.

Na meiose, o milheto apresenta sete bivalentes e dois quiasmas em cada um, exceto o bivalente nucleolar, que apresenta um quiasma (Techio, Davide e Pereira, 2006). Uma baixa taxa de anormalidade foi observada por esses autores, em que a ascensão precoce de cromossomos foi a mais freqüente nos genótipos analisados. No entanto, a porcentagem de tétrades normais e a alta viabilidade do pólen mostraram que as fases subseqüentes da meiose não foram afetadas e que os cromossomos adiantados foram incluídos nos núcleos em formação.

## **2.2 Estratégias de melhoramento do capim-elefante**

O melhoramento genético de plantas envolve um conjunto de procedimentos, com fundamentação científica, visando à alteração de características de interesse botânico-agronômicas e à obtenção de cultivares superiores, a partir da manipulação da variabilidade genética existente no germoplasma de determinado grupo.

No Brasil, uma das preocupações da pecuária leiteira é o melhoramento de gramíneas forrageiras, visando à obtenção de materiais com maior produção de forragem e qualidade nutritiva e, conseqüentemente, elevando a produção de leite por unidade de área (Abreu, 2002).

O capim-elefante, mesmo sendo cultivado por todo território nacional, carece de cultivares melhoradas para as diferentes condições edafoclimáticas e sistemas de utilização, devido à existência de poucos programas de melhoramento (Pereira et al., 2001).

Buscando obter novas combinações gênicas para atender à demanda nacional por cultivares forrageiras superiores, a Embrapa Gado de Leite, em 1991, iniciou o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético do capim-elefante, buscando cultivares que apresentam maior velocidade de crescimento, maior produtividade, melhor qualidade forrageira, maior eficiência na utilização de nutrientes, distribuição mais eqüitativa da produção de matéria seca durante o ano, elevada produção de sementes viáveis para a propagação via semente, tolerância à seca e resistência ao pisoteio, a pragas e doenças (Pereira, 1994).

A opção pelo melhoramento genético do capim-elefante reside no fato de ser uma forrageira cultivada em todo país, tradicionalmente utilizada pelos produtores de leite e com elevada produção de matéria seca (Pereira et al., 2001).

Entre as estratégias adotadas pelos programas de melhoramento do capim-elefante pode-se citar a introdução de cultivares, considerada a mais simples em razão da rapidez na obtenção dos resultados e pelos baixos custos envolvidos. Todavia, a chance de introdução de cultivares superiores é pequena, em função das condições ambientais diferentes entre os locais de coleta e introdução (Bueno et al., 2001). Além disso, no caso específico do capim-elefante, não existem programas de melhoramento que possam servir de fonte para a introdução de material genético melhorado.

Uma alternativa é a exploração da variabilidade existente na própria espécie, ou seja, a obtenção de populações segregantes por meio de hibridações intra-específicas que, segundo Hanna (1999), constitui uma boa estratégia para se obter cultivares superiores.

Além disso, o capim-elefante apresenta alta capacidade de trocar alelos com outras espécies de *Pennisetum*, possibilitando a realização de hibridações interespecíficas e, conseqüentemente, aumento da variabilidade e incorporação de novos fenótipos favoráveis. Várias possibilidades de cruzamentos entre espécies de *Pennisetum* são encontradas na literatura (Dujardin & Hanna, 1985; Hanna, 1999; Jauhar, 1981; Jauhar & Hanna, 1998; Schanck, 1999), permitindo o desenvolvimento de genótipos úteis para a produção de forragem. A hibridação interespecífica entre o capim-elefante e o milho, objetivando associar algumas características desejáveis das duas espécies (Pereira et al., 2000), tem sido proposta como uma alternativa viável nos programas de melhoramento do capim-elefante.

Nos híbridos, o milho contribui com caracteres como vigor, resistência à seca, tolerância a doenças, qualidade forrageira e tamanho das sementes, enquanto que rusticidade, agressividade, perenidade, boa palatabilidade e elevada produtividade de matéria seca são conferidas pelo capim-elefante.

O híbrido, originado do cruzamento entre o capim-elefante e o milheto, é denominado PMN (*pearl millet and napiergrass*) e foi descrito, pela primeira vez, em 1944 por Burton. Este híbrido assemelha-se mais ao capim-elefante, em função da maior contribuição genética (genomas A'B), do que ao milheto (genoma A). Além disso, o genoma B do capim-elefante é dominante em relação ao genoma A do milheto (Gonzalez & Hanna, 1984).

Jahuar & Hanna (1998) consideram o híbrido entre capim-elefante e milheto o mais importante desse gênero por apresentar produção e qualidade forrageira superiores aos de seus genitores. Segundo Pereira et al. (1999), os híbridos triploides têm apresentado grande variabilidade para caracteres de importância forrageira. Alguns materiais foram selecionados e apresentaram 23% de proteína bruta nas folhas, valor este superior à média de 16% encontrada para o capim-elefante.

No entanto, essas duas espécies apresentam níveis de ploidia diferentes, pois o capim-elefante é alotetraploide e o milheto é diplóide. A hibridação entre ambas as espécies produz um híbrido triploide com  $2n = 3x = 21$  cromossomos e genomas AA'B infértil. A principal causa da esterilidade do híbrido triploide é o número de cromossomos não balanceado. Essa infertilidade do híbrido é um fator limitante aos programas de melhoramento, pois impede sua utilização em cruzamentos e sua propagação por sementes.

A restauração da fertilidade do híbrido pode ser conseguida pela duplicação do conjunto cromossômico utilizando bloqueadores mitóticos, produzindo um híbrido hexaploide com  $2n = 6x = 42$  cromossomos e genomas AAA'A'BB (Barbosa, 2004; Dujardin & Hanna, 1985; Hanna, 1981; Hanna et al., 1984; Hanna & Dujardin, 1986) que, segundo esses autores, apresentam meiose regular, levando à produção de sementes maiores e mais vigorosas. Esse procedimento possibilitaria a propagação desses híbridos via semente e

viabilizaria a expansão das áreas cultivadas de capim-elefante, trazendo consideráveis contribuições para a pecuária leiteira (Schanck, 1999).

Recentemente, foi lançada, pela empresa Matsuda, a primeira cultivar de capim-elefante propagada por sementes, denominada 'Paraíso'. Essa cultivar é um híbrido hexaplóide que erroneamente tem sido divulgada como uma nova espécie, *Pennisetum hybridum* (Reis, 2005).

### **2.3 Meiose em híbridos interespecíficos**

A precisa segregação dos cromossomos durante a meiose é essencial para assegurar uma divisão celular normal, garantindo a propagação das células e a formação de gametas viáveis e, assim, a sobrevivência da espécie.

Em espécies agronomicamente importantes é comum o uso de hibridações intra e interespecíficas visando ao aumento da variabilidade genética no gênero. No entanto, os cruzamentos interespecíficos podem formar híbridos cujo comportamento meiótico é irregular, podendo levar à total infertilidade dessas plantas. Isso ocorre, principalmente, em função dos diferentes níveis de ploidia ou de homologia encontrados em espécies do mesmo gênero. Dessa forma, torna-se necessário considerar esses fatores nas hibridizações como uma maneira de driblar a barreira da esterilidade.

#### **2.3.1 Pareamento cromossômico**

De acordo com Singh (2002), conclusões erradas podem ser obtidas se a hipótese da existência de parentesco genômico for baseada apenas na formação de híbridos férteis ou estéreis, sem a análise do pareamento cromossômico, pois híbridos entre espécies geneticamente similares, quando se esperava que fossem férteis, são, na verdade, estéreis. Isso pode ocorrer devido a alelos complementares letais, diferenciação em genes e estrutura cromossomal.

Para Crane & Sleper (1989), o pareamento cromossômico em híbridos serve para avaliar as relações genômicas entre as espécies envolvidas no cruzamento, e, segundo Gale & Miller (1987), fornece um importante ponto inicial em programas de introgressão.

O grau de pareamento cromossômico observado nos híbridos interespecíficos é importante para inferir relação de parentesco filogenético entre espécies, contribui para o entendimento da evolução dos gêneros e gera informação sobre espécies ancestrais (Singh, 2002).

A alta afinidade de pareamento entre os cromossomos é uma garantia de que as barreiras de isolamento reprodutivo que separam as espécies são quebradas, permitindo a troca de material genético entre as espécies (Zwierzykowski et al., 1999).

Risso-Pascotto et al. (2005), ao analisarem o comportamento meiótico em híbridos interespecíficos entre *Brachiaria ruziziensis* e *Brachiaria brizantha*, observaram que a maioria dos cromossomos pareou-se como bivalentes, embora tenham sido encontrados trivalentes e quadrivalentes. Ressaltam, ainda, que estes resultados indicam uma relação próxima entre essas espécies e que é possível a ocorrência de recombinação genética entre os híbridos. No entanto, os autores enfatizam a necessidade de análises cuidadosas da eficiência reprodutiva dos híbridos antes da utilização dos mesmos como genitores em programas de melhoramento.

Geralmente, espécies com genomas similares mostram pareamento cromossômico completo ou quase completo em seus híbridos. No gênero *Triticum*, por exemplo, as espécies silvestres existentes na mesma área geográfica, *T. monococcum* e *T. urartu*, possuem genomas A e exibem sete bivalentes em seus híbridos, havendo, portanto, pareamento completo. No cruzamento de *T. turgidum* ( $2n = 4x = 28$ ) com *T. urartu* ( $2n = 2x = 14$ ), o híbrido originado é um triploide  $2n = 3x = 21$  e a configuração apresentada na

diacinese e metáfase I mostra a formação de sete bivalentes e sete univalentes. Johnson (1975) sugere que *T. turgidum* seja um alotetraplóide carregando o genoma A derivado de *T. monococcum* e *T. urartu*. Essas duas espécies possuem cariótipos idênticos e diferença insignificante no conteúdo de DNA nuclear, sugerindo que elas apresentem genomas similares.

No gênero *Glycine*, todos os híbridos resultantes do cruzamento entre espécies com genoma A e B mostraram 20 bivalentes na maioria dos meiócitos. No entanto, o cruzamento entre *G. microphylla* (B) e *G. tabacina* (B<sub>2</sub>) revelou um baixo índice de afinidade genômica, o que sugere que os genomas B e B<sub>2</sub> apresentam algumas diferenças (Singh, 2002).

Híbridos entre *Cucumis hystrix* (2n = 2x =24) e *Cucumis sativus* (2n = 2x =14) mostraram 19 univalentes na diacinese, indicando uma baixa afinidade entre os genomas H (*C. hystrix*) e C (*C. sativus*). Após a duplicação do número cromossômico, esses híbridos passaram a exibir 21 bivalentes na meiose e uma baixa taxa de associações multivalentes, confirmando, assim, a divergência entre os genomas H e C (Chen et al., 2003).

O grau de diferenciação entre as espécies hibridizadas pode ser estabelecido não somente pela análise do pareamento cromossômico, mas também pela estimativa e análise de anormalidades meióticas (Rieseberg et al., 2000).

### **2.3.2 Anormalidades meióticas**

Os híbridos interespecíficos, por apresentarem em seu núcleo diferentes genomas de diferentes espécies, mesmo sendo genomas similares, podem apresentar anormalidades meióticas que poderão afetar diretamente o potencial reprodutivo da planta.

A análise de híbridos interespecíficos entre *Brachiaria ruziziensis* e *Brachiaria brizantha*, por Risso-Pascotto et al. (2005), mostrou que a fertilidade

do pólen foi afetada por algumas anormalidades meióticas, tais como segregação cromossômica irregular, cromossomos pegajosos e citocinese anormal, que levaram a uma esterilidade de mais de 65% dos grãos de pólen. Segundo os autores, a migração precoce e tardia de cromossomos para os pólos e a formação de micronúcleos foram observadas em alta frequência, em ambas as divisões meióticas. Tais anormalidades são típicas de poliplóides e foram amplamente registradas em poliplóides de várias espécies do gênero *Brachiaria* (Mendes-Bonato et al., 2001; 2002; Risso-Pascotto et al., 2003; Risso-Pascotto, Pagliarini & Valle, 2005).

Os micronúcleos originados na primeira divisão da meiose dos híbridos de *Brachiaria* podem permanecer como micronúcleo durante a segunda divisão ou ser incorporados na placa metafásica. De acordo com Risso-Pascotto et al. (2005), ambos os casos foram observados por meio da análise da prófase II de tais híbridos. Já os micrósporos originados na meiose II resultaram da citocinese anormal após a telófase I. Estes fenômenos foram também relatados em *B. decumbens* (Mendes-Bonato et al., 2002) e *B. brizantha* (Risso-Pascotto et al., 2003). A presença de cromossomos pegajosos foi verificada em baixa frequência entre os meiócitos e sua causa não é conhecida, apesar de ser um fenômeno comum no gênero *Brachiaria* (Risso-Pascotto et al., 2005).

A terminalização precoce de quiasmas é um evento que pode levar à segregação irregular na metáfase I, Pagliarini (1990) observou que a terminalização dos quiasmas nos bivalentes, ainda na diacinese, foi a principal causa da esterilidade dos grãos de pólen em *Aptenia cordifolia*.

O estudo meiótico do alopoliplóide originado do cruzamento intergenérico entre *Triticum turgidum* var. *carthlicum* e *Thinopyrum junceiforme* mostrou a ocorrência de várias anormalidades. Ellneskog-Staam & Merker (2002) afirmam que estes alopoliplóides não apresentam estabilidade citogenética e nem genética. Além da formação de univalentes, anormalidades

como segregação irregular, pontes e assincronia foram observadas na meiose I e II. Neste trabalho, os autores utilizaram a técnica hibridização genômica *in situ* (GISH) para determinar o número de cromossomos de *Thinopyrum* encontrados no híbrido e relatam uma alta variação no número cromossômico, mostrando que os cromossomos são rapidamente eliminados e que não há nenhum padrão de pareamento dos genomas de ambas as espécies na meiose.

Distúrbios meióticos são bastante conhecidos e considerados comuns em poliplóides originados recentemente e têm sido amplamente estudados em Triticale, anfidiplóide entre trigo e centeio.

### **2.3.3 Eliminação cromossômica**

Após a fertilização interespecífica, é comum a ocorrência de eliminação cromossômica, pois dois diferentes genomas parentais são reorganizados dentro de um núcleo. Essa nova constituição genômica pode resultar em conflitos intergenômicos, conduzindo a rearranjos genéticos (Riddle & Birchler, 2003). Segundo Feldman et al. (1997), uma eliminação específica de seqüências de DNA acontece nos primeiros estágios após a hibridação.

A eliminação cromossômica somática é um mecanismo que pode levar ao isolamento reprodutivo, podendo ser total ou parcial de um dos genomas parentais como consequência da condição híbrida, ou seja, ocorre um desajuste entre os genomas de espécies diferentes (Abreu, 2002).

Na família Poaceae, encontram-se algumas das espécies mais estudadas neste aspecto, como os híbridos de *Hordeum*, *Avena*, *Brassica*, *Triticum*, *Zea* e *Pennisetum* (Sundberg & Glimelius, 1991; Germand et al., 2005; Techio et al., 2006).

O processo de eliminação cromossômica em híbridos tem sido intensivamente estudado e várias hipóteses foram propostas na tentativa de explicá-lo, tais como: inativação dos cromossomos por nucleases, formação de

fusos multipolares, assincronia na síntese de nucleoproteínas que pode levar à segregação tardia, separação espacial de genomas durante a interfase e na metáfase, supressão da função do centrômero nos cromossomos eliminados e assincronia nas fases do ciclo celular (Adamowski et al., 1998). Muitos mecanismos de eliminação cromossômica têm sido descritos, incluindo fragmentação dos cromossomos, formação de micronúcleos, degradação da cromatina, não orientação dos cromossomos na metáfase e cromossomos atrasados na anáfase (Singh, 2002).

Na meiose, o mesmo processo de eliminação pode ser evidenciado. Trabalhos com *Avena sativa* demonstraram a ocorrência de eliminação cromossômica na meiose via formação de micronúcleos em tétrades (Baptista-Giacomelli et al., 2000a). Foram observadas também a não orientação dos cromossomos homólogos na metáfase I e a ascensão precoce de cromossomos na anáfase I, indicando a ocorrência de eliminação cromossômica.

Linde-Laursen & von Bothmer (1999) afirmam que o mecanismo de eliminação cromossômica é bastante sensível e influenciado, tanto por fatores genéticos quanto por fatores ambientais.

Adamowski et al. (1998) sugerem que a eliminação cromossômica pode ser induzida pelas condições fisiológicas das células. Pickering (1985) mostrou que os cromossomos de *Hordeum bulbosum*, em híbridos interespecíficos entre *H. bulbosum* e *H. vulgare*, são eliminados poucos dias após a fertilização e sugere a influência da temperatura na velocidade da eliminação cromossômica, indicando que as condições ambientais podem influenciar na estabilidade do híbrido.

A ocorrência de eliminação cromossômica durante a microsporogênese de um acesso de *Paspalum subciliatum* foi ressaltada por Adamowski et al. (1998). Segundo estes autores, a meiose do alopoliplóide ( $2n = 4x = 40$ ) foi normal até a diacinese, quando a formação de 20 bivalentes foi observada.

Durante a metáfase I, o comportamento dos cromossomos passou a ser anormal; enquanto dez bivalentes encontravam-se na placa metafásica, os outros dez permaneciam no citoplasma. Na anáfase I, os cromossomos mostraram segregação irregular e posterior formação de micronúcleos na telófase I. Na segunda divisão da meiose, o comportamento dos cromossomos foi o mesmo, mostrando clara assincronia no ciclo celular. Tais anormalidades afetaram a viabilidade do pólen. Os autores afirmam a ocorrência de uma barreira de incompatibilidade que impede a coexistência de genomas divergentes no mesmo sistema celular.

As eliminações cromossômicas podem ocorrer espontaneamente em organismos de populações naturais, como, por exemplo, em híbridos de *Hordeum vulgare* e *Hordeum bulbosum*, ou podem ser induzidas experimentalmente para atender a uma demanda da agricultura por produção de haplóides (Pickering, 1985).

A eliminação cromossômica em híbridos interespecíficos é uma poderosa ferramenta nos programas de melhoramento, facilitando a produção de linhas de adição e a substituição por meio da eliminação cromossômica diferencial, enquanto a eliminação total de um genoma permite a formação de linhagens haplóides. A eliminação de micronúcleo em micrósporos, acompanhada do reconhecimento preciso dos cromossomos eliminados, pode também ser útil em programas de melhoramento (Baptista-Giacomelliet al., 2000a).

#### **2.3.4 Meiose em híbridos entre capim-elefante e milheto**

Estudos do pareamento cromossômico no híbrido triplóide entre capim-elefante e milheto mostraram que, dos 21 cromossomos, 14 formavam bivalentes e 7 permaneceram como univalentes. A formação dos 7 bivalentes é atribuída à sinapse entre os genomas A' do capim-elefante e A do milheto, enquanto que os

sete univalentes pertencem ao genoma B do capim-elefante (Krishnaswamy e Raman, 1954).

Pantulu (1967), observando o paquíteno, verificou que os cromossomos 1 a 5 do milheto apresentam homologia com os mesmos cromossomos do capim-elefante e os cromossomos 6 e 7 do milheto têm homologia com os cromossomos 8 e 14 do capim-elefante, respectivamente. As configurações mostrando a formação de sete bivalentes e sete univalentes na meiose dos híbridos são consideradas normais, ou seja, meiócitos com essa configuração são tidos como normais, apesar de inférteis (Krishnaswamy e Raman, 1954).

Vários autores relataram a ocorrência de irregularidades meióticas em híbridos triplóides entre capim-elefante e milheto. Sethi et al. (1970) observaram a presença de meiócitos, mostrando configurações variando de um trivalente + sete bivalentes + quatro univalentes a quatro bivalentes + treze univalentes. O comportamento dos trivalentes e dos univalentes, conforme esperado, foi muito irregular na anáfase I, sendo possível verificar a ocorrência de 5 a 11 cromossomos nos dois pólos e também de univalentes atrasados, o que resultou em baixa viabilidade dos grãos de pólen.

Sree Rangaswamy (1972) também relatou a ocorrência de configurações anormais na prófase I da meiose, mostrando associações na diacinese, apresentando mais de sete bivalentes. O autor atribuiu este fato à ocorrência de pareamento autossindético ou a associações heterocromáticas. Hanna (1981) e Jauhar (1981) observaram, ainda, a formação de pontes cromossômicas, tétrades anormais e formação de grãos de pólen inviáveis.

Techio et al. (2006), analisando três genótipos de híbridos triplóides entre capim-elefante e milheto, relataram a ocorrência de anormalidades desde as fases iniciais até a formação dos produtos meióticos. Para os três genótipos, os autores observaram, em média, 49,3% de anormalidade. Entre as anormalidades observadas, encontram-se formação de univalentes e

multivalentes, ascensão precoce de cromossomos tanto na primeira divisão meiótica quanto na segunda, segregação irregular, pontes simples e múltiplas, cromossomos pegajosos, núcleo assincrônico, formação de células com tamanhos desiguais, citomixia, fuso anormal, células binucleadas e formação de micronúcleos.

A formação de mais de sete bivalentes na diacinese não foi observada por Techio et al. (2006), não confirmando, assim, a ocorrência de pareamento autossindético sugerida por Sree Rangaswamy (1972). No entanto, os autores relataram a ocorrência de configurações trivalentes e tetravalentes no milheto, sugerindo a existência de homologia intragenômica nessa espécie.

O fato de esses híbridos serem triplóides é apontado, por vários autores (Jauhar 1981; Sethi et al., 1970; Sree Rangasamy, 1972; Techio et al., 2006), como a causa das anormalidades e conseqüente infertilidade, pois resulta na formação de univalentes, os quais levam à segregação irregular, induzindo à perda de material genético e originando gametas aneuplóides.

Completa inviabilidade dos grãos de pólen foi relatada por Techio et al. (2006), para os três híbridos triplóides analisados, por meio das técnicas convencionais de coloração e germinação *in vitro*, o que é coerente com as altas taxas de irregularidades meióticas encontradas. Correlações entre fertilidade e irregularidades meióticas foram altas e negativas, confirmando que quanto maior o número de meiócitos anormais, menor é a taxa de viabilidade do pólen.

A restauração da fertilidade desses híbridos é de grande interesse pelos programas de melhoramento, pois sua forragem é mais produtiva e de maior aceitação pelos bovinos do que o próprio capim-elefante (Jauhar, 1981).

Uma alternativa para restaurar a fertilidade dos híbridos é a utilização de antimitóticos, levando assim à duplicação do conjunto cromossômico, dando condições a essas plantas de apresentarem meiose normal e, conseqüentemente,

a formação de sementes, o que é o principal interesse dos programas de melhoramento.

Segundo Hanna (1981), os híbridos hexaplóides induzidos apresentam megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário normal, como o capim-elefante e, para Jauhar (1968), esses híbridos geralmente formam 21 bivalentes na meiose e, raramente, ocorre associação multivalente, comportando-se meioticamente como típicos diplóides. No entanto, o autor chegou a essa conclusão apenas pela ocorrência de formação de sementes e não foram realizadas análises citogenéticas.

Em contrapartida, Glidenhuys & Brix (1961, 1964), citados por Abreu (2002), descrevem que esses híbridos hexaplóides demonstram instabilidade no número cromossômico somático, apresentando uma variação de 36 a 49 cromossomos e com  $2n = 6x = 42$  ocorrendo mais frequentemente. Os autores atribuem essa variação no número cromossômico a um controle genético.

Quanto à origem, pode-se dizer que os híbridos hexaplóides surgiram de uma hibridação interespecífica seguida de poliploidização induzida, estando o homem, neste caso, conduzindo a evolução das plantas a seu favor. Segundo Abreu (2002), a indução de poliploidia não é tarefa fácil, pois as metodologias variam muito, principalmente com relação aos tipos e tempos de ação dos indutores, as concentrações e os tecidos alvo, buscando sempre uma maior eficiência do tratamento. Porém, uma vez conseguida a poliploidização, a frequência de plantas mixoplóides é grande e a de poliplóides estáveis é muito pequena.

Como já citado vários são os estudos que demonstram a ocorrência de anormalidades meióticas, porém, além destes estudos, é necessária a averiguação da viabilidade do produto direto da meiose, o grão de pólen, bem como a produção e a viabilidade da semente.

## 2.4 Viabilidade do pólen

A viabilidade do grão de pólen é requerida e imprescindível nos programas de melhoramento genético, pois é por meio dele que a troca de material genético se torna possível nos cruzamentos, possibilitando a formação da semente. Os dados de viabilidade permitem fazer correlações com anormalidades meióticas e auxiliam na seleção de genótipos, o que o torna uma ferramenta de extrema utilidade nas áreas agrícola e biotecnológica (Techio, 2002).

A análise da viabilidade do pólen pode ser feita por várias maneiras. No entanto, as principais são a utilização de corantes nucleares e os testes de germinação *in vitro*.

A utilização de corantes consiste em um procedimento simples, barato e bastante atrativo, por fornecer os resultados rapidamente. A estimativa é dada pela contagem dos pólenes corados e não corados que se mostram viáveis e inviáveis, respectivamente. Vários corantes são empregados neste fim, como carmim acético, azul de anilina, azul de algodão, iodeto de potássio, fluoresceína di-acetato e verde malaquita com fucsina básica.

Pelo fato dos grãos de pólenes inviáveis não serem corados, Alexander (1969, 1980) questionou a utilização desses corantes, pois grãos de pólen com paredes espessas, mucilaginosas e com presença de espículas dificultam a penetração do corante e, assim, sua coloração, podendo, equivocadamente, classificar pólenes viáveis que não apresentaram coloração como abortados.

Como uma alternativa, Alexander (1969, 1980) sugeriu a utilização de um corante à base de fucsina básica e verde malaquita, em que o pólen viável corar-se de vermelho e o inviável corar-se de verde, permitindo uma melhor diferenciação. No entanto, não há, na literatura, um teste de viabilidade universal com a utilização de um corante específico. Recomenda-se, então, que a determinação da viabilidade dos grãos de pólen seja realizada a partir de vários

testes que poderão auxiliar na padronização de um protocolo adequado para a espécie em estudo.

Na germinação *in vitro*, o pólen é espalhado sobre um meio de cultura contendo sacarose (Cangianni, 1988 citado por Techio, 2002) e a viabilidade é observada por meio da porcentagem de grãos de pólen que emitem tubo polínico. O grão de pólen é considerado viável quando o comprimento do seu tubo é maior que o seu diâmetro (Shivanna & Rangaswamy, 1982).

Uma outra maneira de obter dados seguros sobre a viabilidade dos grãos de pólen é por meio da polinização controlada, também chamada germinação *in vivo*, em que se faz a polinização utilizando o pólen a ser analisado, podendo ser utilizada a autopolinização ou a polinização cruzada. Após a polinização, é necessário manter a inflorescência protegida para que não haja contaminação com pólenes indesejáveis e, após alguns dias, observa-se se a formação da semente ocorreu devidamente. O resultado é obtido com a formação da semente, ou seja, os pólenes poderão ser considerados viáveis se a polinização resultar na formação da semente. Este método não é muito utilizado por não ser tão simples e também em função da demora para a obtenção dos resultados. Para algumas angiospermas, por exemplo, são necessários 1 a 3 meses para a produção de sementes (Stanley & Linskens, 1974), porém, os resultados gerados são de extrema segurança.

Segundo Techio (2002), a maioria dos estudos sobre viabilidade do pólen para *Pennisetum* foi realizada na década de 1970, utilizando carmim acético (Sethi et al., 1970; Sree Ramulu, 1968; Sree Rangasamy, 1972). Para o milheto, foi observada uma taxa de fertilidade variando de 87% a 97% (Sethi et al., 1970; Sree Ramulu, 1968; Sujatha et al., 1989), já para o capim-elefante, observou-se uma variação de 61% a 95%. Para os híbridos entre o capim-elefante e o milheto, os mesmos autores observaram de 2% a 5% de pólenes viáveis.

Techio et al. (2006), ao analisarem três genótipos de milho utilizando testes de coloração com o corante de Alexander, observaram alta taxa de fertilidade, atingindo 100% de viabilidade para os três genótipos. Os autores associam a máxima viabilidade ao horário de coleta dos pólenes entre 8:30 e 10 horas, quando as anteras começam a se tornar deiscentes, estando o pólen em seu ponto máximo de viabilidade. Outros pontos que explicam a maior taxa de viabilidade no milho são sua condição diplóide, estabilidade genética e a não ocorrência de irregularidades no processo meiótico.

Para germinação *in vitro*, para os mesmos três genótipos, Techio et al. (2006) relataram uma baixa frequência de pólenes funcionais mesmo utilizando vários testes com diferentes concentrações e composições para os meios de cultura. Segundo Ayyangar & Rao (1935), os grãos de pólen do milho, assim como os de espécies de *Andropogon* e *Sorghum*, sofrem plasmólise e não germinam em meio de cultura.

Analisando três genótipos de capim-elefante, Techio et al. (2006) observaram alta taxa de fertilidade, chegando 99,9% e 99,8% para dois genótipos; já para o terceiro, a taxa foi de 71,7%, utilizando os testes de coloração. Várias anormalidades meióticas foram relatadas para o genótipo que apresentou menor viabilidade dos grãos de pólen e, provavelmente, tais anormalidades refletiram na viabilidade dos pólenes.

Para a germinação *in vitro* do capim-elefante, Techio et al. (2006) relataram um comportamento similar ao do milho, com uma frequência muito baixa de pólenes viáveis. Estes autores atribuíram este fato às condições oferecidas pelo meio de cultura, não refletindo as condições *in vivo*.

Ao analisar híbridos triplóides entre capim-elefante e milho, Techio et al. (2006) relataram total inviabilidade dos grãos de pólen, tanto pelos testes de coloração quanto por germinação *in vitro*, e atribuíram este resultado às

altas taxas de anormalidades meióticas encontradas para este híbrido, devido a sua condição triplóide.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o material biológico utilizado pertence ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Gado de Leite. Foram avaliados dez híbridos hexaplóides entre capim-elefante e milheto, sendo quatro genótipos selecionados de uma população obtida pela Embrapa Gado de Leite a partir de híbridos hexaplóides introduzidos, em 1995, da Universidade da Florida, Estados Unidos; um genótipo selecionado da cultivar comercial 'Paraíso' e os demais obtidos por indução de poliploidia de híbridos triplóides obtidos, no Brasil, por Barbosa (2004), os quais se encontram relacionados na Tabela 1. Os híbridos hexaplóides foram avaliados quanto à ocorrência de irregularidades meióticas, número cromossômico somático e viabilidade do pólen.

**TABELA 1** Híbridos hexaplóides nacionais e americanos.

Híbridos hexaplóides	
Híbridos nacionais	Híbridos americanos
05	02
32	03
35	04
46	20
89	Paraíso

### **3.1 Análise meiótica**

Para a análise meiótica, as inflorescências foram coletadas em vários estágios de desenvolvimento, entre 8h30min e 10h30min, fixadas em álcool etílico: ácido propiônico (3:1) e armazenadas, a -4°C, até o momento de serem avaliadas. As coletas foram realizadas no período de abril a julho, em 2005 e 2006.

As lâminas foram preparadas de acordo com protocolo convencional para estudos meióticos, descrito por Techio (2002), utilizando a técnica de esmagamento e coloração com carmim propiônico 1%.

Para cada planta, foram observadas, em média, 1.300 células, quantificando-se as células em estágios normais e as anormais. Foram também obtidas as frequências de anormalidades para o total de células analisadas.

### **3.2 Análise mitótica**

A análise mitótica foi feita a partir de células meristemáticas de pontas de raízes obtidas pelo enraizamento de estacas. Para a obtenção de metáfases, foi utilizada a técnica de esmagamento e coloração com Giemsa 10%. Raízes com, aproximadamente, 1 a 2 cm, foram pré-tratadas em solução de ciclohexamida 25 mg.L<sup>-1</sup> e hidroxiquinoleína 300 mg.L<sup>-1</sup> (1:1) por 2h45min, sendo posteriormente fixadas em solução Carnoy. Após a fixação, as raízes foram submetidas à maceração enzimática em solução de pectinase por um período de quatro horas. A extração e a fragmentação do meristema foram realizadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio.

### **3.3 Viabilidade do pólen**

A viabilidade do pólen foi estimada pela capacidade de coloração e germinação *in vitro*.

Utilizando o corante de Alexander (Alexander, 1980), foram considerados viáveis os pólenes que apresentaram coloração roxa e inviáveis aqueles corados de verde.

A germinação do grão de pólen foi induzida em meio de cultura contendo 9g de sacarose, 30mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 10mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  e 0,7 g de ágar diluídos em 100mL de água destilada. Os grãos de pólen retirados de anteras provenientes de panículas recém-coletadas foram espalhados sobre uma placa contendo o meio. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa com temperatura de 27°C, durante 5 horas. A viabilidade do pólen foi dada em função da porcentagem de pólenes germinados, sendo considerados viáveis aqueles grãos de pólen que apresentavam tubo polínico com comprimento igual ou superior ao seu diâmetro.

Nas análises de viabilidade do pólen, tanto pela capacidade de coloração quanto pela germinação *in vitro*, foram avaliados 1.000 grãos de pólen por planta. Para as mensurações do diâmetro do grão de pólen foram avaliados 1000 grãos de pólen por híbrido, coletados em diferentes inflorescências. As medidas foram feitas utilizando-se o programa Sigma Scan Pro v. 2.00.

As fotomicrografias dos meiócitos e grãos de pólen foram feitas com fotomicroscópio Olympus BX60 e utilizando o software Optronics.

As associações entre as irregularidades meióticas e os valores de viabilidade do pólen (testes de coloração e germinação *in vitro*) foram avaliadas por meio da correlação de Pearson.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Anormalidades meióticas

Várias irregularidades foram observadas na meiose dos híbridos hexaplóides analisados, desde as fases iniciais até a formação do grão de pólen. As taxas de anormalidades foram altas para todos os híbridos analisados. Os híbridos nacionais apresentaram taxas de anormalidades que variaram de 65,14% (híbrido 05) a 74,72% (híbrido 32), como pode ser visto na Tabela 2. Já os híbridos americanos obtidos apresentaram taxas de anormalidades variando de 59,46% (híbrido 02) a 70,84% (híbrido 20) (Tabela 3).

**TABELA 2** Frequência observada (%) de células com anormalidades meióticas para os híbridos hexaplóides nacionais.

Fases da meiose	% anormalidades				
	05	32	35	46	89
Prófase I <sup>1</sup>	80,00	74,60	84,44	82,50	75,38
Metáfase I	74,68	86,24	68,64	66,34	79,05
Anáfase I	64,63	77,06	71,97	71,28	71,50
Telófase I	65,87	62,24	53,24	69,67	59,00
Prófase II	57,30	68,57	51,14	70,59	62,00
Metáfase II	60,00	80,00	57,89	0,00	64,71
Anáfase II	0,00	0,00	75,00	100,00	70,00
Telófase II	53,90	65,49	55,56	64,00	61,54
Tétrade	55,66	68,23	64,15	59,89	57,30
Total	65,14	74,72	65,29	67,38	68,74

<sup>1</sup> Células em diacinese

**TABELA 3** Frequência observada (%) de células com anormalidades meióticas para os híbridos americanos.

Fases da meiose	% anormalidades				
	02	03	04	20	Paraíso
Prófase I <sup>1</sup>	80,00	80,00	79,69	69,86	77,55
Metáfase I	62,57	67,45	69,74	80,67	73,21
Anáfase I	63,19	68,28	69,34	79,42	75,67
Telófase I	52,74	56,55	52,06	62,50	65,66
Prófase II	60,29	57,75	53,85	63,98	53,13
Metáfase II	40,00	66,67	25,00	68,18	57,69
Anáfase II	62,50	50,00	0,00	75,00	56,25
Telófase II	60,10	63,01	56,16	64,60	55,74
Tétrade	46,94	69,48	48,13	66,45	54,58
Total	59,46	66,36	63,61	70,84	68,03

<sup>1</sup> Células em diacinese

As altas taxas de anormalidades meióticas encontradas para os híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho podem ser devido à reunião dos genomas homeólogos A' e A do capim-elefante e milho, respectivamente, que se encontram duplicados. Além disso, pode-se mencionar a possibilidade de que as duas espécies (*P. purpureum* e *P. glaucum*), individualmente, apresentam ciclos celulares diferentes e, portanto, quando cruzadas, pode não ocorrer sincronia entre os genomas durante a divisão celular, levando à ocorrência de anormalidades meióticas.

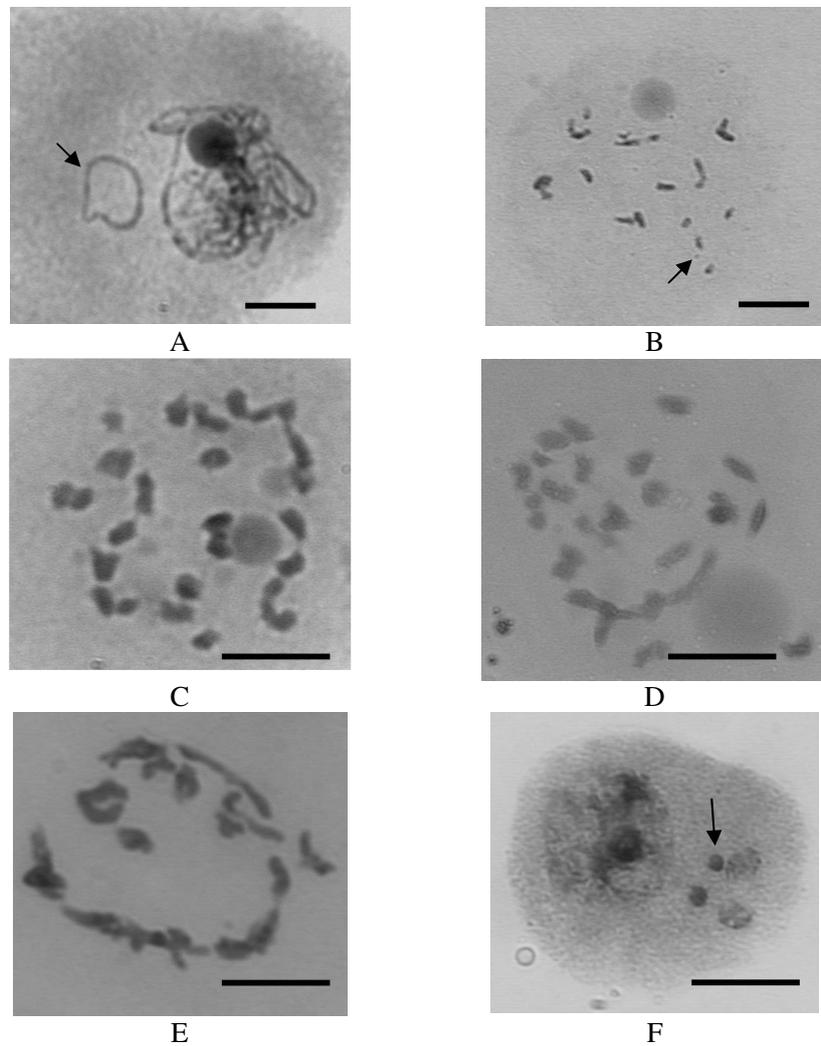
Ao analisar híbridos triplóides de capim-elefante e milho, Techio et al. (2006) relataram alta frequência de distúrbios meióticos, chegando até a 52,4% e apontam como causa das anormalidades a sua condição triplóide, que leva a formação de univalentes, resultando em segregação irregular e formação de gametas aneuplóides.

Contrariamente aos resultados observados neste trabalho, Hanna (1981) relatou que os híbridos hexaplóides induzidos apresentam megasporogênese e desenvolvimento do saco embrionário normal, como o capim-elefante e Jauhar (1968) relata que esses indivíduos hexaplóides, geralmente, formam 21 bivalentes na meiose e raramente ocorre associação multivalente, comportando-se meioticamente como típicos diplóides. No entanto, o autor chegou a essa conclusão apenas pela constatação de formação de sementes e não realizou análises citogenéticas.

Foram analisadas, em média, 50 células em diacinese (Prófase I) por híbrido (nacionais e americanos), as quais apresentaram alta taxa de anormalidade. Entre os híbridos nacionais, a maior taxa de anormalidade foi observada para o híbrido 35 (84,44%) e a menor para o híbrido 32, que apresentou 74,60% de anormalidade nas células em diacinese (Tabela 2). Já para os híbridos americanos, as taxas mais elevadas de anormalidades foram encontradas para os híbridos 02 e 03 (80%) e a menor para o híbrido 20 (69,86%), como pode ser observado na Tabela 3.

Entre as anormalidades observadas na prófase I, as mais freqüentes foram: número incorreto (reduzido) de cromossomos, formação de univalentes e multivalentes em anel e em cadeia (Figuras 1 A, B, C, D, E). O número reduzido de cromossomos na diacinese evidencia a perda cromossômica antes da meiose. Este fato corrobora com a ocorrência de micronúcleos nas fases iniciais da meiose, provavelmente originados nas divisões mitóticas que antecedem a meiose (Figura 1F). Este fato também foi observado por Techio, Davide e Pereira (2006) ao analisarem a meiose de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto. Os autores atribuíram a ocorrência de micronúcleos nas fases iniciais da meiose à ocorrência de citomixia ou de mitoses pré-meióticas.

A freqüência de univalentes e multivalentes foi alta e variou entre os híbridos analisados, chegando a atingir de 50% a 75% das anormalidades



**FIGURA 1** Meiócitos dos híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho (*P. purpureum* e *P. glaucum*). A. Paquíteno com anel de translocação (seta); B. Diacinese com número reduzido de cromossomos e univalentes (seta); C e D. Diacinese com configurações multivalentes; E. Diacinese com cromossomos em cadeia. F. Início da prófase I com micronúcleos (seta). As barras representam 5  $\mu\text{m}$ .

encontradas na prófase I. Isso pode ter ocorrido em função da presença de quatro genomas A no híbrido hexaplóide e da ausência de genes supressores do pareamento homeólogo.

O comportamento dos univalentes, de acordo com Sybenga (1992), na maioria das vezes, não é normal e pode influenciar na fertilidade dos produtos meióticos, pois, na metáfase, eles, geralmente, não permanecem alinhados na placa equatorial e tendem a migrar precocemente para os pólos, podendo ou não ser incluídos nos núcleos em formação na telófase I. Os univalentes que apresentarem segregação tardia darão origem a micronúcleos nas fases subseqüentes da meiose, levando à formação de gametas aneuplóides. Foi observada alta frequência de associações multivalentes em cadeia e também em anel, indicando a ocorrência de pareamento cromossômico incorreto, esse em função da ocorrência de translocações.

Jauhar (1968) e Techio et al. (2006), ao analisarem o pareamento cromossômico nos híbridos triplóides de capim-elefante e milheto, observaram que a maioria dos bivalentes formados resultou do pareamento alossindético envolvendo os cromossomos do genoma A e A' e que muitos desses bivalentes eram heteromórficos devido à diferença de tamanho dos cromossomos do capim-elefante e do milheto.

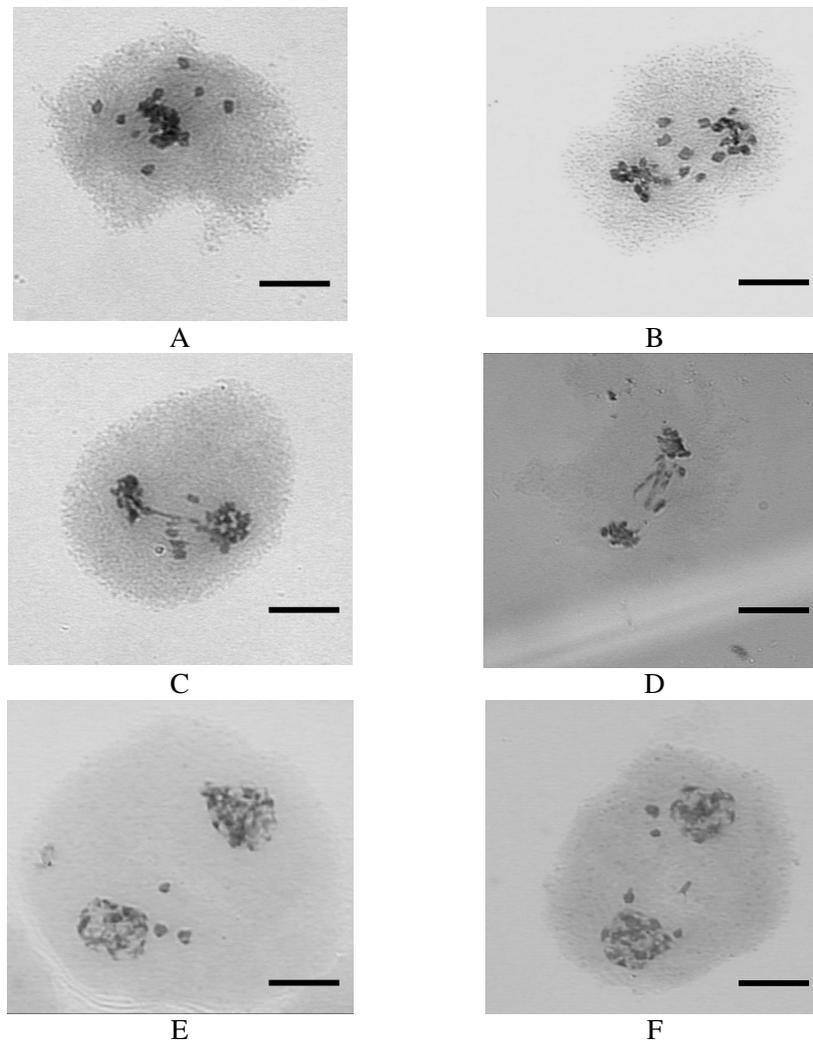
Jauhar (1975) refere-se a essa tendência para a formação de bivalentes entre os genomas A e A' como pareamento preferencial, sugerindo a ocorrência de homeologia entre os genomas referidos. A existência de homeologia entre os genomas A e A' pode ser a principal causa da alta frequência de pareamento incorreto nos híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto, pois a reunião de quatro genomas A, sem a presença de genes supressores do pareamento homeólogo, pode levar à formação de quadivalentes, trivalentes e univalentes na meiose desses híbridos, o que pode resultar na formação de gametas inviáveis.

Várias anormalidades foram observadas em alta frequência nas fases subseqüentes à prófase I, entre elas destacam-se migração precoce dos cromossomos, cromossomos atrasados, formação de pontes simples e múltiplas e formação de micronúcleos na telófase I e prófase II (Figuras 2 A, B, C, D, E e F). Estes resultados concordam com os obtidos por Techio et al. (2006) ao estudarem híbridos triplóides de capim-elefante e milho. Tais anormalidades são típicas, também, de outras espécies poliplóides, como, por exemplo, em espécies pertencentes ao gênero *Brachiaria* (Risso-Pascotto et al., 2005).

Entre as anormalidades mais frequentes durante a microsporogênese dos híbridos analisados, pode-se destacar ascensão precoce, segregação irregular dos cromossomos e formação de micronúcleo.

A ascensão precoce dos cromossomos (Figura 2A), tanto para os híbridos nacionais quanto para os americanos, foi responsável por cerca de 22,10% e 24,59%, respectivamente, das irregularidades encontradas na meiose I (Tabelas 4 e 5). Torna-se necessário mencionar que, possivelmente, a principal causa dessa irregularidade é a ocorrência de ciclos celulares diferentes entre as duas espécies que compõem os híbridos e, portanto, quando cruzadas, não ocorre sincronia entre os genomas durante a divisão celular.

A segregação irregular dos cromossomos foi observada nos dez híbridos estudados e representou, em média, 10,18% (híbridos nacionais) e 9,33% (híbridos americanos) das anormalidades observadas durante a meiose I (Tabelas 4 e 5 e Figura 2B). Resultados similares também foram observados por Techio et al. (2006), porém, em menor frequência (7%) para híbridos triplóides. Esta anormalidade causa efeitos drásticos à célula, visto que pode ocasionar a perda de material genético. Além de observada na meiose I, esta anormalidade foi também observada na segunda divisão meiótica.



**FIGURA 2** Meiócitos dos híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho (*P. purpureum* e *P. glaucum*). A. Metáfase I com ascensão precoce de cromossomos; B. Anáfase I com cromossomos atrasados; C. Anáfase I com ponte simples (seta); D. Anáfase I com pontes múltiplas; E. Telófase I com micronúcleos; F. Prófase II com micronúcleos. As barras representam 5 µm.

**TABELA 4** Tipos e frequência observada (%) de células com anormalidades meióticas para os híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho nacionais.

Anormalidades	%				
	05	32	35	46	89
Univalentes	0,40	0,80	0,37	0,31	0,58
Multivalentes	0,63	0,96	0,55	0,46	1,05
Cadeias	0,95	1,04	0,30	0,84	0,77
Nº incorreto de cromossomos	1,19	0,96	1,10	0,92	2,30
Ascensão precoce de cromossomo	21,34	23,68	23,33	19,49	22,63
Meiose I Segregação irregular	6,88	12,00	11,94	12,05	8,05
Micronúcleo	4,03	4,56	5,54	4,22	3,74
Pontes	5,30	6,00	3,90	4,91	4,31
Cromossomos pegajosos	1,50	0,88	0,00	1,07	1,25
Núcleo assincrônico	0,63	0,72	0,91	0,69	1,05
Células desiguais	0,00	0,00	0,55	0,00	0,00
Fusos anormais	2,29	1,04	0,43	0,08	1,73
Ascensão precoce	0,24	0,32	0,67	0,00	1,05
Meiose II Segregação irregular	0,00	0,00	0,61	0,08	0,67
Micronúcleo	8,38	10,64	5,54	12,51	8,15
Pontes	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00
Células desiguais	0,40	0,00	0,49	0,00	0,38
Núcleo assincrônico	1,26	0,64	0,67	1,61	1,25
P. meióticos <sup>1</sup> Tríade	1,03	0,72	0,67	0,46	0,48
Políade	0,00	0,24	0,24	0,00	0,29
Tétrade com micronúcleo	7,43	8,64	7,19	7,14	8,15
Tétrade com micrósporo anucleado	1,26	0,88	0,18	0,54	0,86
Total	65,14	74,72	65,29	67,38	68,74

<sup>1</sup>P. meióticos = Produtos meióticos.

**TABELA 5** Tipos e frequência observada (%) de células com anormalidades meióticas para os híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho americano.

Anormalidades	%				
	02	03	04	20	P. <sup>2</sup>
Univalentes	0,35	0,31	0,52	0,35	0,16
Multivalentes	0,45	0,43	0,46	0,47	0,31
Cadeias	0,00	0,25	0,87	0,82	0,47
Nº incorreto de cromossomos	0,60	0,49	1,10	1,35	0,99
Ascensão precoce de cromossomos	20,86	22,88	30,76	21,34	27,09
Meiose I Segregação irregular	10,58	7,67	6,56	8,70	13,13
Micronúcleo	7,30	3,71	2,90	10,52	4,46
Pontes	5,56	4,45	6,09	5,53	3,17
Cromossomos pegajosos	0,15	0,31	0,41	0,00	0,00
Núcleo assincrônico	0,30	0,49	0,58	3,64	1,19
Células desiguais	2,24	0,12	0,58	0,00	0,00
Fusos anormais	0,00	0,87	0,70	0,29	1,30
Ascensão precoce	0,20	0,25	0,06	0,88	0,78
Meiose II Segregação irregular	0,20	0,06	0,00	0,35	0,42
Micronúcleo	4,47	7,42	4,59	7,76	6,23
Pontes	0,05	0,00	0,00	0,18	0,10
Células desiguais	0,75	1,24	0,70	0,76	0,42
Núcleo assincrônico	0,84	0,62	0,75	1,82	0,42
P. meióticos <sup>1</sup> Tríade	0,20	0,56	0,64	0,47	0,83
Políade	0,00	0,43	0,17	0,18	0,26
Tétrade com micronúcleo	4,27	12,24	4,06	5,41	5,97
Tétrade com micrósporo anucleado	0,10	1,55	1,10	0,00	0,36
Total	59,46	66,36	63,61	70,84	68,03

<sup>1</sup>P. meióticos = Produtos meióticos; <sup>2</sup> P. = Híbrido 'Paraíso'.

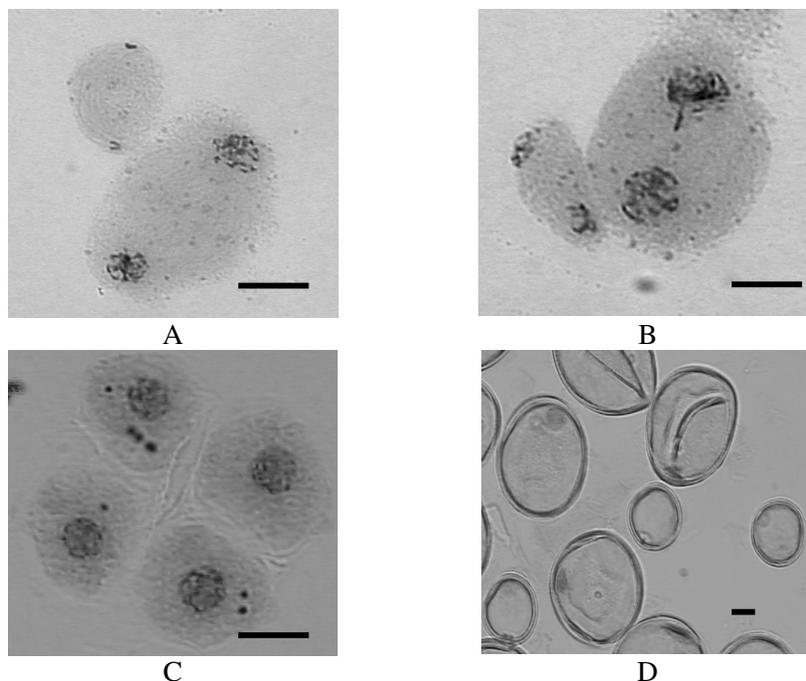
É importante mencionar que, entre os fatores que colaboram para a segregação irregular dos cromossomos, encontra-se a formação de fusos anormais. Portanto, faz-se necessário enfatizar que a correta formação das fibras do fuso é um fator que colabora com a precisa segregação dos cromossomos durante a mitose e a meiose, garantindo uma divisão normal, assegurando a propagação das células e a sobrevivência das espécies.

Houve mal-formação das fibras do fuso na maioria dos híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto analisados (Tabelas 4 e 5). No híbrido 05 (nacional), essa anormalidade alcançou sua maior frequência, chegando a 2,29% do total das células analisadas; já nos híbridos americanos, sua frequência foi menor, atingindo 1,30% no híbrido 'Paraíso' e não foi observada no híbrido 02. Ao estudar a meiose em três híbridos triplóides de capim-elefante e milheto Techio, Davide e Pereira (2006) observaram a ocorrência de fusos anormais em apenas um dos três híbridos na meiose I, a uma frequência de 0,1%.

No entanto, Mendes-Bonato et al. (2006) relataram a ocorrência de orientação anormal do fuso durante a microsporogênese de híbridos interespecíficos entre *Brachiaria ruziziensis* e *Brachiaria brizantha*, que afetou 40% dos meiócitos, o que compromete a utilização desse determinado híbrido em sistemas de produção.

Na telófase I, foi constatada a ocorrência de micronúcleos indicando a presença de cromossomos retardatários não incluídos nos núcleos em formação (Figura 2E). Além disso, foi observada a ocorrência de microcélulas adicionais (Figura 3A e B), que apresentam segregação cromossômica. Foram observados micronúcleos nas tétrades (Figura 3C) e nos micrósporos. Provavelmente, os micronúcleos deram origem a grãos de pólen pequenos e inférteis (Figura 3D).

Na meiose, o processo de eliminação foi evidenciado por Baptista-Giacomelli et al. (2000a), os quais, trabalhando com *Avena sativa*, demonstraram a ocorrência de eliminação cromossômica na meiose via



**FIGURA 3** Meiócitos dos híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho (*P. purpureum* e *P. glaucum*). A e B. Microcélula com segregação cromossômica; C. Tétrade com micronúcleos; D. Grãos de pólen reduzidos. As barras representam 5 $\mu$ m.

formação de micronúcleos em tétrades. Foram observados também a não orientação dos cromossomos homólogos na metáfase I e a ascensão precoce de cromossomos na anáfase I, indicando a ocorrência de eliminação cromossômica.

Em estudo da meiose de um acesso de *Paspalum subciliatum*, foi relatada a ocorrência de eliminação cromossômica (Adamowski et al., 1998). Segundo os autores, durante a anáfase I, os cromossomos mostraram segregação irregular e posterior formação de micronúcleos na telófase I.

O processo de eliminação cromossômica também pode ser evidenciado neste trabalho por meio da análise mitótica dos híbridos hexaplóides, a qual

revelou uma incoerência no número cromossômico, revelando variação entre 14 a 42 cromossomos em células de uma mesma planta, evidenciando que a instabilidade cromossômica também ocorre nas células somáticas desses híbridos. Esses resultados não eram esperados, uma vez que esses genótipos apresentaram 42 cromossomos, quando avaliados após indução de duplicação (Barbosa, 2004).

Como consequência da eliminação cromossômica, observou-se grande variação no diâmetro dos grãos de pólen, característica que, de acordo com Katsiotis & Forsberg (1995), pode variar em função do número cromossômico e do nível de ploidia da planta. Entre os hexaplóides nacionais, o diâmetro médio do grão de pólen variou de 38,46 $\mu$ m (híbrido 32) a 55,61 $\mu$ m (híbrido 46), com média geral de 46,42 $\mu$ m (Tabela 6). Ao considerar o conjunto de anormalidades capazes de propiciar a eliminação de cromossomos, pode-se perceber que o híbrido 32 é o que apresenta maior frequência (Tabela 2), por conseguinte, justifica-se o menor diâmetro apresentado por este híbrido.

Já entre os híbridos americanos, aquele que apresentou maior diâmetro médio foi o híbrido 02 (51,87 $\mu$ m) e o híbrido 04 apresentou menor diâmetro (24,52 $\mu$ m). A média geral entre os híbridos americanos foi de 41,51 $\mu$ m (Tabela 6). O híbrido 02 apresenta uma menor taxa de anormalidade (Tabela 3), podendo-se inferir que isso pode ter levado a uma menor taxa de eliminação cromossômica, o que justifica o maior diâmetro do grão de pólen apresentado por este híbrido.

Após a fertilização interespecífica, é comum a ocorrência de eliminação cromossômica, pois a presença de genomas diferentes no núcleo pode resultar em conflitos intergenômicos, levando à reorganização dessa nova combinação.

**TABELA 6** Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) médio do grão de pólen para os híbridos nacionais e americanos.

Híbridos nacionais	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>	Híbridos americanos	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) <sup>1</sup>
05	44,54 b	02	51,87 e
32	38,46 a	03	46,05 d
35	45,12 b	04	24,52 a
46	55,61 d	20	44,45 c
89	48,38 c	Paraíso	39,83 b
Média	46,42	Média	41,51

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Foi constatada a ocorrência de pontes cromossômicas e fragmentos (Figuras 2C e D), em alta frequência, em todos os híbridos analisados, as quais estavam acompanhadas ou não de fragmentos na microsporogênese. Durante a meiose I, entre os híbridos nacionais, o que apresentou maior frequência de pontes foi o híbrido 32 (6,00%); já entre os híbridos americanos, foi observada uma frequência de 6,09% para o híbrido 04 (Tabelas 4 e 5). Geralmente, foram observadas pontes simples, embora, em alguns casos, tenha sido detectada a ocorrência de pontes múltiplas (Figura 2D).

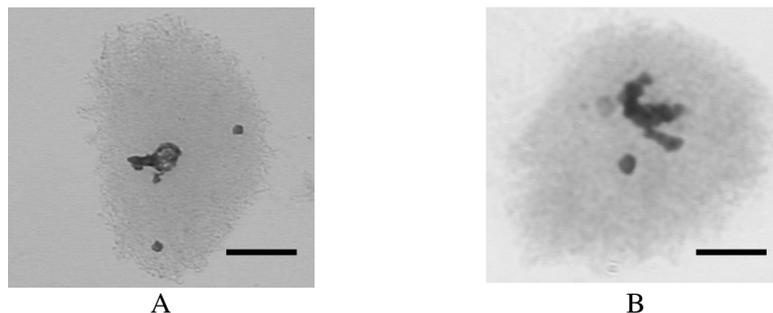
Alguns estudos sobre meiose de híbridos triplóides entre capim-elefante e milho, realizados por Sethi et al. (1970), Sree Rangasamy (1972) e Techio et al. (2006), também demonstraram a ocorrência de pontes cromossômicas, as quais atribuem às inversões a principal causa desta irregularidade. Segundo Sybenga (2002), a causa provável é a ocorrência de inversões paracêntricas, caso as pontes estejam acompanhadas de fragmentos. A ausência de fragmentos é justificada por Santos-Serejo (1999) como sendo devido a quebras no

centrômero, de forma que os braços migram para pólos opostos, podendo originar novos cromossomos.

Baptista-Giacomelli et al. (2000b) relatam que pontes cromossômicas podem ser geradas por cromossomos pegajosos. Neste trabalho, a maioria dos híbridos avaliados apresentou cromossomos pegajosos (Figura 4A e B). Na tentativa de correlacionar a ocorrência dessa irregularidade à formação de pontes cromossômicas, observou-se, entre os híbridos nacionais, que o 35 apresentou menor frequência de pontes (3,90%) e não apresentou cromossomos pegajosos. No entanto, essa correlação não ocorreu entre os híbridos americanos. Os híbridos 20 e 'Paraíso' não apresentaram cromossomos pegajosos, estando o 20 entre os que apresentaram maior frequência de pontes e o 'Paraíso' a menor (Tabela 5). Assim, no caso dos híbridos analisados, provavelmente, as pontes estão associadas ao ciclo quebra-fusão-ponte e a inversões.

#### 4.2 Viabilidade do pólen

Todas as anormalidades observadas neste trabalho comprometem a viabilidade do grão de pólen como conseqüência imediata da produção de gametas não balanceados.



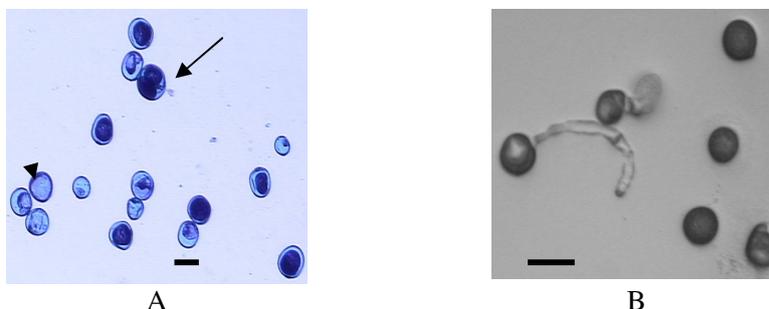
**FIGURA 4** Meiócitos dos híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto (*P. purpureum* e *P. glaucum*). A e B. Cromossomos pegajosos. As barras representam 5  $\mu$ m.

Na Tabela 7 encontram-se os valores de viabilidade do pólen obtidos por dois métodos: coloração (Figura 5A) e germinação *in vitro* (Figura 5B), para os híbridos nacionais e americanos. Por meio desses métodos foi possível observar altas taxas de inviabilidade do grão de pólen.

Para o teste de coloração (Tabela 7), foi observada, entre os híbridos nacionais, frequência de pólen viáveis variando de 0,17% (híbrido 32) a 34,21% (híbrido 35). Já para os híbridos americanos, a frequência de pólen viáveis variou de 2,39% (híbrido 20) a 49,96% (Paraíso). Diante do exposto, parece razoável pensar que as irregularidades observadas durante a divisão celular foram as principais causas da baixa frequência de pólen viáveis.

Sethi et al. (1970), Sree Ramulu (1968) e Sree Rangasamy (1972) estudaram a viabilidade polínica por meio de corantes nucleares e observaram que os híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milho apresentaram fertilidade que variou de 2% a 5%. Em contrapartida, Techio et al. (2006) estudaram três híbridos triploides de capim-elefante x milho e não detectaram a presença de pólen viável por meio da técnica de coloração. Estes autores sugeriram que a completa esterilidade observada nos três híbridos triploides revela que a combinação dos complementos cromossômicos parentais não refletiu em graus variáveis de fertilidade nesses híbridos, embora eles apresentem diferentes frequências de irregularidades.

As frequências de pólen viáveis, obtidas por meio da técnica de germinação *in vitro* (Tabela 7), para os híbridos nacionais, variaram de 25,24% (híbrido 89) a 30,71% (híbrido 35), enquanto que, para os híbridos americanos, observou-se uma alta variação, 8,82% (híbrido 20) a 86,17% (Paraíso). É necessário ressaltar que não foi possível obter dados de germinação *in vitro* para os híbridos 05 e 32 (nacionais) devido a não deiscência das anteras. No entanto, para os híbridos 02 e 04 (americanos) foi perdida a época de florescimento.



**FIGURA 5** Meiócitos dos híbridos hexaplóides de capim-elefante e milheto (*P. purpureum* e *P. glaucum*). A. Grãos de pólen viáveis (seta) e inviáveis (ponta de seta) corados com corante de Alexander; B. Grãos de pólen em meio de cultura para germinação. As barras representam 20 µm.

**TABELA 7** Frequência de grãos de pólen viáveis (%) obtidos por meio da técnica de coloração e germinação *in vitro* para os acessos híbridos hexaplóides nacionais e americanos.

Híbridos nacionais	VPC <sup>1</sup>	VPG <sup>2</sup>
05	19,67	-
32	0,17	-
35	34,21	30,71
46	22,59	28,99
89	7,47	25,24
Híbridos americanos	VPC <sup>1</sup>	VPG <sup>2</sup>
02	8,65	-
03	30,97	30,96
04	49,24	-
20	2,39	8,82
Paraíso	49,96	86,17

<sup>1</sup>VPC = Viabilidade do pólen por coloração; <sup>2</sup>VPG = Viabilidade do pólen por germinação.

As elevadas taxas de anormalidades meióticas, aliadas às baixas frequências de viabilidade do pólen, refletem o comportamento meiótico instável dos dez híbridos avaliados.

A fertilidade do pólen deve ser adequada para garantir a produção de sementes. Para que os híbridos possam ser largamente utilizados nos sistemas de produção, eles devem produzir boa quantidade de sementes viáveis para atender à demanda de extensivas áreas de pasto, portanto, a produção de grãos de pólen férteis é requerida. Ao considerar este aspecto, o híbrido 'Paraíso' merece destaque especial, visto que apresenta alta frequência de pólen viáveis, observada tanto pelo teste de coloração (49,96%) quanto pelo teste de germinação (86,17%). Porém, devido à elevada frequência de irregularidades meióticas (68,03%) apresentada por este híbrido, a sua eficiência reprodutiva deve ser cuidadosamente avaliada.

#### **4.3 Correlações entre fertilidade e irregularidades meióticas**

Foi realizada uma análise de correlação entre frequência de anormalidades e frequência de pólen viáveis, obtida pelo método de coloração (Tabela 8), para os híbridos nacionais, obtendo-se um valor de -0,85. Esse resultado concorda com a afirmação de que as irregularidades observadas ao longo da meiose são repassadas para o produto final, o grão de pólen. No entanto, para os híbridos americanos, não houve correlação ( $r = -0,01$ ) entre as frequências de anormalidades e o método de coloração, embora o híbrido 20 tenha sido o que apresentou maior taxa de irregularidades meióticas (70,84%). Ao analisar três híbridos triplóides de capim-elefante e milheto, Techio et al. (2006) observaram que a correlação entre a taxa de viabilidade obtida por coloração e frequência de irregularidades meióticas foi alta e negativa (-0,99).

Correlação alta e negativa ( $r = -0,94$ ) foi observada entre as frequências de anormalidades meióticas e o teste de viabilidade do pólen, por meio da germinação *in vitro* (Tabela 8), para os híbridos nacionais, indicando que as irregularidades durante a divisão meiótica foram transmitidas ao pólen, porém, para os híbridos americanos foi observada uma correlação menor ( $r = -0,41$ ). Techio (2002) observou correlação alta e negativa ( $r = -0,71$ ) entre a frequência de pólenes viáveis obtida por germinação *in vitro* e a frequência de anormalidades meióticas.

Sree Ramulu (1968), ao trabalhar com o híbrido hexaplóide entre capim-elefante e milho, não observou correlação entre os distúrbios meióticos e o grau de esterilidade do pólen.

Ao avaliar o grau de associação entre a fertilidade, obtida pela coloração e germinação *in vitro*, observaram-se valores altos e positivos, indicando que os dados obtidos pelas duas técnicas foram consistentes com os dados de irregularidades meióticas. Isso alvitra a possibilidade de uso dos resultados

**TABELA 8** Correlações entre anormalidades meióticas (%) e grãos de pólenes viáveis (%) obtidos por meio da técnica de coloração e germinação *in vitro* para os híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho nacionais e americanos.

Origem dos híbridos	Correlações (%)		
	r (ac) <sup>1</sup>	r (ag) <sup>2</sup>	r (cg) <sup>3</sup>
Híbridos nacionais	-0,85	-0,94	0,99
Híbridos americanos	-0,01	-0,41	0,94

<sup>1</sup> r (ac) = Correlação entre % de anormalidades meióticas e % de viabilidade do pólen por coloração; <sup>2</sup> r (ag) = Correlação entre % de anormalidades meióticas e % de viabilidade do pólen por germinação *in vitro*; <sup>3</sup> r (cg) = Correlação entre % viabilidade do pólen por coloração e % de viabilidade do pólen por germinação *in vitro*.

de testes de fertilidade como estimativa de distúrbios meióticos, uma vez que oferece a vantagem de uma avaliação rápida da situação de uma espécie quanto ao processo de formação dos gametas e estabilidade genética.

Faz-se necessário um importante comentário sobre a possibilidade de utilização dos híbridos nacionais em futuros ensaios de avaliação de cultivares, visto que estes apresentam taxas de anormalidades meióticas semelhante à dos híbridos americanos. Deve-se considerar, também, o fato de que o híbrido americano 'Paraíso' já é utilizado comercialmente e os outros híbridos americanos já passaram por três ciclos de seleção sucessivos, ressaltando o potencial que os híbridos nacionais apresentam para o desenvolvimento de novas cultivares. Há também a possibilidade dos híbridos nacionais produzirem sementes viáveis dado que o híbrido 'Paraíso' produz sementes viáveis.

## **5 CONCLUSÕES**

Os híbridos hexaplóides entre capim-elefante e milheto apresentaram alta taxa de anormalidades meióticas, as quais favoreceram a formação de grãos de pólen com número cromossômico desbalanceado e inférteis.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. C. de. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milheto tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 72 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ADAMOWSKI, E. V.; PAGLIARINI, M. S.; BATISTA, L. A. R. Chromosome elimination in *Paspalum subciliatum* (Notata group). **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 11, n. 5, p. 272-276, 1998.

ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, Baltimore, v. 44, n. 3, p. 117-122, 1969.

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen from fungi, yeast and bacteria. **Stain Technology**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.

AYYANGAR, G. N. R.; RAO, V. P. Pollen dummy. **Current Science**, Bangalore, v. 19, p. 315, 1935.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Elimination of micronuclei from microspore in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 2, p. 681-684, June 2000a.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F. R.; PAGLIARINI, M. S.; ALMEIDA, J. L. Multiple anaphase bridges on meiosis in Brazilian oats (*Avena sativa* L.). **Nucleus**, Lahore, v. 43, n. 1, p. 58-63, 2000b.

BARBOSA S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Cytogenetic of *Pennisetum purpureum* Schumach. x *Pennisetum glaucum* L. hybrids and their parents. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 26-35, jan./fev. 2003.

BARBOSA, S. **Citogenética de híbridos entre *Pennisetum purpureum* Schumack e *Pennisetum glaucum* L. e seus genitores**. 2000. 48 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BARBOSA, S. **Micropropagação e duplicação cromossômica de híbridos triplóides de capim-elefante e milheto**. 2004. 119 p. Tese (Doutorado em

Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRUNKEN, J. N. A systematic study of *Pennisetum* Sect. *Pennisetum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 64, n. 2, p. 161-176, Feb. 1977.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.

CHEN, J.; STAUB, J.; QIAN, C.; JIANG, J.; LUO, X.; ZHUANG, F. Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Chakr. x *Cucumis sativus* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, n. 4, p. 688-695, Feb. 2003.

CRANE, C. F.; SLEPER, D. A. A model of meiotic chromosome association in triploids. **Genome**, Ottawa, v. 32, n. 1, p. 82-89, Feb. 1989.

DUJARDIN, M.; HANNA, W. W. Cytology and reproductive behavior of pearl millet-napiergrass hexaploids x *Pennisetum squamulatum* triespecif hybrids. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 76, n. 5, p. 382-384, 1985.

ELLNESKOG-STAAM, P.; MERKER, A. Chromosome composition, stability and fertility of allopolyploids between *Triticum turgidum* var. *carthlicum* and *Thinopyrum junceiforme*. **Hereditas**, Copenhagen, v. 136, n. 1, p. 59-65, 2002.

FELDMAN, M.; LIU, B.; SEGAL, G.; ABBO, S.; LEVY, A. A.; VEGA, J. M. Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploidy wheat: A possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosome. **Genetics**, Baltimore, v. 147, n. 3, p. 1381-1387, Nov. 1997.

GALE, M. D.; MILLER, T. E. The introduction of alien genetic variation into wheat. In: LUPTON, F. G. H. (Ed.). **Wheat breeding: its scientific basis**. London: Chapman & Hall, 1987. p. 173-210.

GERNAND, D.; RUTTEN, T.; VARSHNEY, A.; RUBTSOVA, M.; PRODANOVIC, S.; BRÜB, C.; KUMLEHN, J.; MATZK, F.; HOUBEN, A. Uniparental Chromosome Elimination at Mitosis and Interphase in Wheat and Pearl Millet Crosses Involves Micronucleus Formation, Progressive Heterochromatinization, and DNA Fragmentation. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 9, p. 2431-2438, Sept. 2005.

GONZALEZ, B.; HANNA, W. W. Morphological and fertility responses in isogenic triploid and hexaploid pearl millet x napiergrass hybrids. **Journal Heredity**, New York, v. 75, n. 4, p. 317-318, 1984.

HANNA, W. W. Melhoramento do capim-elefante. In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. (Ed.) **Biologia e Manejo do Capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 17-28.

HANNA, W. W. Method of reproduction in napiergrass and in the 3X and 6X allopolyploid hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 21, n. 1, p. 123-126, Jan./Feb. 1981.

HANNA, W. W.; DUJARDIN, M. Cytogenetic of *Pennisetum schweinfurthii* Pilzer and its hybrids with pearl millet. **Crop Science**, Madison, v. 26, n. 3, p. 499-553, May/June 1986.

HANNA, W. W.; GAINES, T. P.; GONZALEZ, B.; MONSON, W. G. Effect of ploidy on yield and quality of pearl millet x napier grass hybrids. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, n. 6, p. 969-971, Nov./Dec. 1984.

HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. Toward a rational classification of cultivated plants. **Taxon**, Utrecht, v. 20, p. 509-517, 1971.

JAUHAR, P. P. **Cytogenetics and breeding of pearl millet and related species**. New York: Alan R. Liss, 1981.

JAUHAR, P. P. Genetic control of diploid-like meiosis in hexaploid tall fescue. **Nature**, London, v. 254, n. 5501, p. 595-597, Apr. 1975.

JAUHAR, P. P. Inter- and intragenomal chromosome pairing in an inter-specific hybrid and its bearing on the basic chromosome number in *Pennisetum*. **Genetica**, Dordrecht, v. 39, n.3/4, p. 360-370, 1968.

JAUHAR, P. P.; HANNA, W. W. Cytogenetics and genetics of pearl millet. **Advances in Agronomy**, New York, v. 64, p. 1-26, 1998.

JOHNSON, B. L. Identification of the apparent B-genome donor of wheat. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 17, n. 1, p. 21-39, Mar. 1975.

KRISHNASWAMY, N.; RAMAN, V. S. Studies on the interespecific hybrid of *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. X *P. purpureum* Schumach. III. The cytogenetics of the colchicine-induced amphidiploid. **Genetica**, Dordrecht, v. 27, n. 2, p. 253-272, 1954.

LINDE-LAURSEN, I.; von BOTHMER, R. Orderly arrangement of the chromosomes within barley genomes of chromosome-eliminating *Hordeum lechleri* x barley hybrids. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 2, p. 225-236, Apr. 1999.

KATSIOTIS, A.; FORSBERG, R. A. Pollen grain in four ploidy levels of genus *Avena*. **Euphytica**, Wageningen, v. 83, n. 2, p. 103-108, 1995.

MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVIEV, S.; BROWN, S.; SARR, A. Genome Size Variation and Basic Chromosome Number in Pearl Millet and Fourteen Related *Pennisetum* Species. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 2, p. 139-143, Mar./Apr. 1997.

MARTEL, E.; RICHROCH, A.; SARR, A. Assessment of genome organization among diploid species ( $2n = 2x = 14$ ) belonging to primary and tertiary gene pools of pearl millet using fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 4, p. 680-687, Aug. 1996.

MENDES-BONATO, A. B.; JUNQUEIRA FILHO, R. G.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do; PENTEADO, M. I. O. Unusual cytological patterns of microsporogenesis in *Brachiaria decumbens*: Abnormalities in spindle and defective cytokinesis causing precocious cellularization. **Cell Biology International**, London, v. 26, n. 7, p. 641-646, 2002.

MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do. Abnormal spindle orientation during microsporogenesis in an interspecific *Brachiaria* (Gramineae) hybrid. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 1, p. 122-125, Mar. 2006.

MENDES-BONATO, A. B.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do; PENTEADO, M. I. O. Meiotic instability in invader plants of signal grass *Brachiaria decumbens* Stapf (Gramineae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n. 3, p. 619-625, June 2001.

PAGLIARINI, M. S. Instabilidade meiótica em *Thunbergia mysorensis* (Acanthaceae). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 83-87, jan. 1990.

PANTULU, J. V. Pachytene pairing and meiosis in the F1 hybrid of *Pennisetum typhoides* and *P. purpureum*. **Cytologia**, Tokyo, v. 32, n. 3/4, p. 532-541, 1967.

PANTULU, J. V.; RAO, K. Cytogenetics of pearl millet. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 1-17, 1982.

PANTULU, J. V.; VENKATESWARLU, J. Morphology of pachytene chromosome of *Pennisetum purpureum* Schum. **Genética**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 41-44, 1968.

PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante. In: SIMPÓSIO SOBRE CAPIM-ELEFANTE, 2., 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Coronel Pacheco-MG: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p. 1-11.

PEREIRA, A. V. Germoplasma e diversidade genética do capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. (Ed.) **Biologia e Manejo do Capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 1-16.

PEREIRA, A. V.; FERREIRA, R. P.; PASSOS, L. P.; FREITAS, V. P.; VERNEQUE, R. S.; BARRA, R. B.; SILVA, C. H. P. Variação da qualidade de folhas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e híbridos de capim-elefante x milho (*P. purpureum* x *P. glaucum*), em função da idade da planta. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 490-499, Abr./jun. 2000.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PICKERING, R. A. Partial control of chromosome elimination by temperature in immature embryos of *Hordeum vulgare* L. x *H. bulbosum* L. **Euphytica**, Wageningen, v. 34, n. 3, p. 869-874, 1985.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. dos; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 3. ed. Lavras: Editora UFLA, 2004. 472 p.

RANGASWAMY, S. R. Cytological studies on diploid and polyploidy taxa of the genus *Pennisetum* Rich. **Genetica**, Dordrecht, v. 43, n. 2, p. 257-273, 1972.

REIS, M. C. dos. **Potencial de utilização da seleção recorrente na população de capim-elefante hexaplóide**. 2005. 67 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RIDDLE, N. C.; BIRCHLER, J. A. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. **Trends in Genetics**, London, v. 19, n. 11, p. 597-600, Nov. 2003.

RIESEBERG, L. H.; BAIRD, S. J. E.; GARDNER, K. A. Hybridization, introgression, and linkage evolution. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 42, n.1, p. 205-224, Mar. 2000.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. C.; VALLE, C. B. do. Miotic behavior in interespecific hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *Brachiaria brizantha* (Poaceae). **Euphytica**, Wageningen, v. 145, n.1-2, p. 155-159, Sept. 2005.

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. do; MENDES-BONATO, A. B.. Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). **Plant Breeding**, Berlin, v. 122, n.2, p. 136-140, Apr. 2003.

SANTOS-SEREJO, J. A. **Análise da transmissão e comportamento meiótico de cromossomos alterados em plantas de milho regeneradas *in vitro* e seleção de genótipos para cultura de calos com alta capacidade de regeneração**. 1999. 131 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SCHANCK, S. C. Propagação vegetativa e sexual do capim-elefante. In: PASSOS, L. P.; CARVALHO, L. A.; MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; PEREIRA, A. V. (Ed.). **Biologia e manejo do capim-elefante**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. p. 1-16.

SEARS, E. R. Genetic control of chromosome pairing in wheat. **Annual Review in Genetics**, Palo Alto, v. 10, p. 31-51, 1976.

SETHI, G. S.; KALIA, H. R.; GHAI, B. S. Cytogenetical studies of three interespecific hybrids between *Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb. and *P. purpureum* Schumach. **Cytologia**, Tokio, v. 35, n. 1, p. 96-101, 1970.

SINGH, R. J. **Plant cytogenetics**. 2. Ed. Boca Raton: CRC press, 2002. 463 p.

SHIVANNA, K. R.; RANGASWAMY, N. S. **Pollen biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1982. 119 p.

SREE RAMULU, K. Meiosis and fertility in derivatives of amphiploid *Pennisetum*. **Caryologia**, Firenze, v. 21, n. 2, p. 147-156, 1968.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. **Pollen biology biochemistry management**. Berlin: Springer-Verlag, 1974. 307 p.

STEBBINS, G. L. Longevity, habitat, release of genetic variability in the higher plants. **Cold Spring Symposium Quantitative Biology**, Bungtown, v. 23, p. 365-387, 1958.

SUJATHA, D. M.; MANGA, V.; SUBBA RAO, M. V.; MURTY, J. S. R. Meiotic studies in some species of *Pennisetum* (L.) Rich. (Poaceae). **Cytologia**, Tokyo, v. 54, n. 6, p. 641-652, 1989.

SUNDBERG, E.; GLIMELIUS, K. Effects of parental ploidy and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within Brassicaceae. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 1, p. 81-88, 1991.

SYBENGA, J. **Cytogenetics in plant breeding**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 469 p.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, June 2006.

ZWIERZYKOWSKI, Z.; LUKASZEWSKI, A. J.; NAGANOWSKA, B.; LESNIEWSKA, A. The pattern of homeologous recombination in triploid hybrids of *Lolium multiflorum* with *Festuca pratensis*. **Genome**, Ottawa, v. 42, n. 4, p. 720-726, Aug. 1999.